

УДК 615.074, 615.072

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ РЕПЕШКА ОБЫКНОВЕННОГО *AGRIMONIA EUPATORIA* ПО ФЛАВОНОИДАМ

Ж.С. Лесовая
Д.И. Писарев
О.О. Новиков

*Белгородский
государственный
университет*

e-mail:
zhannalesovaya@yandex.ru

Надземная часть репешка обыкновенного используется в народной медицине при лечении многих заболеваний, в частности, заболеваний печени и желчного пузыря, что обусловлено наличием богатого комплекса биологически активных веществ, среди которых преобладают фенольные соединения, а именно флавоноиды. На основании этого в статье изложена методика оценки качества травы репешка обыкновенного *Agrimonia eupatoria* по флавоноидам.

Ключевые слова: трава репешка обыкновенного, флавоноиды, кверцетин, лютеолин-7-гликозид (цинарозид)

Трава репешка обыкновенного не является официальным растительным сырьем, хотя широко применяется в нетрадиционной медицине [2]. Поэтому актуальным является изучение ее химического состава и разработка методик стандартизации данного вида сырья.

Оценку качества травы репешка обыкновенного предложено проводить по содержанию флавоноидов. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии в пересчете на кверцетин и лютеолин-7-гликозид (цинарозид).

Изучены условия извлечения флавоноидов из сырья этанолом 70% концентрации. Соотношение сырья и общего объема экстрагента 1 : 100, время трехкратного извлечения на кипящей водяной бане 90 минут.

Для расчета суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин оптическую плотность измеряли по собственному поглощению спиртового извлечения травы репешка обыкновенного после гидролиза при длине волны 370 нм. Расчет суммы флавоноидов проводили с использованием оптической плотности раствора стандартного образца кверцетина. Относительная ошибка предложенной методики 4,8%. Содержание флавоноидов в надземной части репешка обыкновенного составило 0,602%.

Для расчета суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид измеряли оптическую плотность окрашенного комплекса, образующегося при взаимодействии с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида, при длине волны 400 нм. Расчет суммы флавоноидов проводили с использованием теоретического значения удельного показателя поглощения государственного стандартного образца лютеолина-7-гликозида (цинарозида). Относительная ошибка предложенной методики 2,6%. Содержание флавоноидов в траве репешка обыкновенного составляет 2,84%.

Целью настоящего исследования является разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве репешка обыкновенного с использованием УФ-спектрофотометрии.

Экспериментальная часть. В результате проведенных исследований нами было установлено, что максимум оптической плотности УФ-спектра собственного поглощения спиртового извлечения из травы репешка после гидролиза совпадает с максимумом оптической плотности УФ-спектра раствора государственного стандартного образца (ГСО) кверцетина при длине волны 370 нм (рис. 1).

В ходе эксперимента было установлено, что наиболее оптимальным экстрагентом, извлекающим наибольшее количество флавоноидов из травы репешка обыкновенного, является 70% этанол.

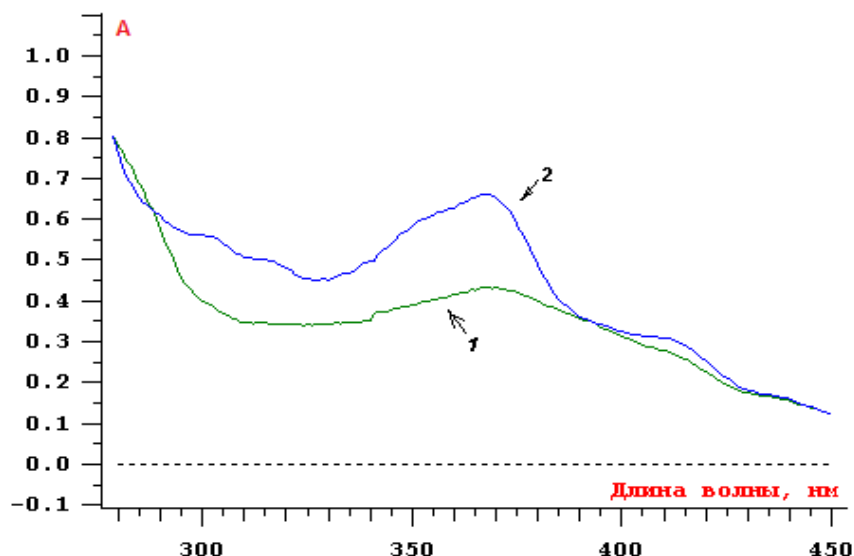


Рис. 1. УФ-спектры раствора ГСО кверцетина (1) и спиртового извлечения травы репешка обыкновенного после гидролиза (2)

Методика получения спиртового извлечения из травы репешка обыкновенного (метод экстракции с использованием этанола 70% концентрации). Точную навеску травы репешка, измельченного до размера частиц 1-3 мм, около 1,0 г поместили в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавили 30 мл 70% этанола, колбу присоединили к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охладили под струей воды до комнатной температуры и содержимое колбы профильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторили еще дважды указанным выше способом. Извлечения профильтровали через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Объем фильтрата довели до метки 96% спиртом. Полноту извлечения флавоноидов из сырья подтвердили отрицательной цианидиновой пробой.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве репешка обыкновенного в пересчете на кверцетин. 10 мл полученного спиртового извлечения из сырья репешка обыкновенного упарили на водяной бане, остаток высушили в сушильном шкафу при 110°C в течение 15 минут, затем растворили в 10 мл 10% серной кислоты. Гидролиз вели в колбе, подсоединенной к обратному холодильнику, при нагревании на кипящей водяной бане в течение 2 часов. В данных условиях происходит гидролиз только 3-О-гликозидов, 7-О-гликозиды, как более устойчивые, гидролизу подвергаются в более жестких условиях. Затем колбу охладили до комнатной температуры и содержимое ее профильтровали через бумажный фильтр. Осадок, оставшийся на фильтре, промыли водой очищенной и растворили в 100 мл горячего 96% этанола.

На спектрофотометре СФ56 измерили оптическую плотность полученного раствора в диапазоне длин волн 300–450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин вели по формуле 1:

$$X = A_x \times C_{ст} \times W \times 100\% / A_{ст} \times C_x \times V_a \quad (1),$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора;

$C_{ст}$ – концентрация раствора стандартного образца кверцетина;

W – разведение, мл;

$A_{ст}$ – оптическая плотность раствора стандартного образца кверцетина;

C_x – концентрация исследуемого раствора;

V_a – объем аликвоты, мл.

Результаты статистической обработки данных параллельных измерений показали, что содержание флавоноидов в траве репешка обыкновенного в пересчете на кверцетин составляет 0,602%, ошибка единичного определения при доверительной вероятности 98% составляет 4,8% (табл. 1).

Таблица 1

Результаты количественного определения суммы флавоноидов

в траве репешка обыкновенного в пересчете на кверцетин

$X (\%)$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
0,571	0,000961	$\bar{X} = 0,602\%$ $\sum (\bar{X} - X)^2 = 0,002571$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,009257$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,029067$ $\varepsilon = 4,8\%$
0,598	0,000016	
0,621	0,000361	
0,609	0,000049	
0,582	0,00004	
0,630	0,000784	
$\bar{X}=0,602$	$\Sigma=0,002571$	

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве репешка обыкновенного в пересчете на лютеолин-7-гликозид (цинарозид). При взаимодействии спиртового извлечения из травы репешка обыкновенного со спиртовым раствором алюминия хлорида наблюдается образование окрашенного комплекса, который вызывает батохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения и при этом дает основной максимум поглощения при длине волны 400 нм (рис. 2).

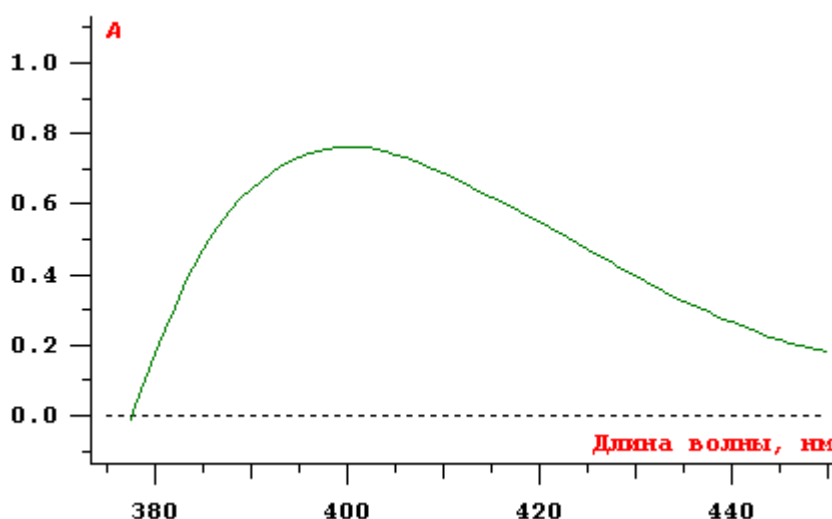


Рис. 2. УФ-спектр комплекса спиртового извлечения из травы репешка обыкновенного с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида

Аналогичный максимум поглощения отмечен для комплекса ГСО лютеолин-7-гликозида (цинарозида).

Таким образом, для определения количества флавоноидов в пересчете на цинарозид 5 мл спиртового извлечения травы репешка поместили в колбу на 25 мл, прибавили 5 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и 2–3 капли разведенной соляной кислоты. Объем смеси довели до метки 96% спиртом этиловым. Время прохождения комплексообразующей реакции в защищенном от света месте 45 минут.

Для приготовления раствора сравнения в колбу вместимостью 25 мл поместили 5 мл спиртового извлечения травы репешка, 2–3 капли разведенной соляной кислоты и довели объем до метки 96% этанолом.

С целью пересчета содержания суммы флавоноидов на цинарозид изучены комплексы раствора ГСО цинарозида с алюминия хлоридом, удельный показатель которых при аналитической длине волны (400 нм) составляет $145,0 \pm 2,3$. На этом основании в формулу расчета включено теоретическое значение $E_{1\%1cm} = 145$ [1].

Расчет вели по формуле 2:

$$X = A_x \times W \times W_2 / E_{1\%1cm} \times m \times V_a, \quad (2)$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора;
 W, W_2 – разведения, мл;
 $E_{1\%1cm}$ – удельный показатель поглощения стандартного раствора цинарозида;
 m – масса навески исследуемого сырья, г;
 V_a – объем аликвоты, мл.

Статистическая обработка данных параллельных измерений показала, что сумма флавоноидов в траве репешка обыкновенного в пересчете на лютеолин-7-гликозид составила в среднем 2,84%. Ошибка единичного измерения равна 2,6% (табл. 2).

Таблица 2

**Результаты количественного определения суммы флавоноидов
 в траве репешка обыкновенного в пересчете на лютеолин-7-гликозид**

X_i (%)	$(X - X_i)^2$	Метрологические характеристики
2,81	0,0009	$X = 2,84\%$ $\Sigma = 0,0166$ $S = 0,023523$ $\Delta X = 0,073862$ $\varepsilon = 2,60\%$
2,79	0,0025	
2,91	0,0049	
2,89	0,0025	
2,77	0,0049	
2,87	0,0009	
$X = 2,84$	$\Sigma = 0,0166$	

Выводы. 1. Проанализированы методы экстракции травы репешка обыкновенного. В качестве наиболее оптимального метода для данного вида сырья выбран метод экстракции с использованием этанола 70% концентрации.

2. Предложена методика дифференциального количественного определения 7-О-гликозидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид (относительная ошибка определения при доверительной вероятности 98% составляет 2,6%) и 3-О-гликозидов в пересчете на кверцетин (относительная ошибка определения при доверительной вероятности 98% составляет 4,8%) после кислотного гидролиза, что позволяет наиболее полно определить содержание флавоноидов в сырье. Общая сумма флавоноидов по результатам данной методики составила $3,442\% \pm 0,1\%$.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., государственный контракт №П425 от 12.05.2010 г.

Литература

1. Андреева, В.Ю. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla Vulgaris* L.S.L. / В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2000. – №1. – С. 85-88.
2. Дикорастущие полезные растения России / Отв.ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. – 663 с.

DEVELOPMENT OF METHODS OF STANDARDIZATION OF HERB OF AGRIMONIA EUPATORIA BY FLAVONOIDS

Zh. S. Lesovaya

D. I. Pisarev

O. O. Novikov

Belgorod State University

e-mail:

zhannalesovaya@yandex.ru

Aboveground part *Agrimonia eupatoria* is commonly used in folk medicine for treating many diseases, particularly diseases of the liver and gallbladder, which is caused by a rich complex of biologically active substances, among which are dominated by phenolic compounds, namely flavonoids. On this basis, the article sets out the methodology quality assessment herbs *Agrimonia eupatoria* of flavonoids.

Key words: herb of *Agrimonia eupatoria*, flavonoids, quercetin, luteolin-7-glucoside (cinarosid)